13 (3) 239-246, Autumn 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Comparison of the use of lactoferrin in combination with feed and sprays in physiological responses of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*)

***Vahid Morshdi* [*1], *Afsaneh Esmaeili* [2], *Shirin Hamedi* [1], *Ebrahim Sotoudeh* [2], *Gholamreza Badzohreh* [3], *Asma Ahmadi* [2], *Rezvan Tamadoni* [2]**

[1] *Department of Fisheries, Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, Iran*
[2] *Department of Fisheries, Faculty of Nano and Bio Science and Technology, Persian Gulf University, Bushehr, Iran*
[3] *Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran*

Key Words

Lactoferrin
Innate immunity
Blood biochemical factors
Hematological factors
Yellowfin seabream
(*Acanthopagrus latus*)

Abstract

Introduction: The aim of this study was to compare the effects of dietary lactoferrin (LF) in combination with feed and sprays on hematological factors and non-specific immune response of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) with an average weight of 10±0.3 g.

Materials & Methods: This study was carried out in a completely randomized design with three treatments and replications in fiberglass tanks with 300 liters volume. Fish were fed with feed containing 0 and 800 mg lactoferrin spray and mix per kg feed for a period of 35 days. At the end of the experiment, blood and plasma samples were collected.

Result: The obtained results indicated that dietary LF did not change yellowfin seabream non-specific immune response except for lysozyme activity ($P>0.05$). TIBC and iron plasma significantly vary in fish fed on 800 mg spray and mixed lactoferrin respectively ($P<0.05$). Hemoglobin value and red and white blood cells count showed significant differences between the control groups with 800 mg mixed lactoferrin ($P<0.05$). Although hematocrit value was influenced by spray lactoferrin ($P<0.05$).

Conclusion: Overall, this study showed that hematological and biochemical factors were affected by dietary lactoferrin. Nonetheless, it can be concluded that feeding of yellowfin seabream on the diet supplemented with 800 mg spray lactoferrin for a period of 5 weeks enhance the non-specific immune response.

* Corresponding Author's email: v.morshedi@gmail.com
Received: 4 June 2020; Reviewed: 9 July 2020; Revised: 4 September 2020; Accepted: 8 October 2020
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.244205.2323

مقاله پژوهشی

مقایسه استفاده از لاکتوفرین به‌صورت مخلوط با غذا و اسپری بر پاسخ‌های فیزیولوژیک ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*)

وحید مرشدی[*1]، *افسانه اسماعیلی*[2]، *شیرین حامدی*[1]، *ابراهیم ستوده*[2]، *غلامرضا بادزهره*[3]، *اسما احمدی*[2]، *رضوان تمدنی*[2]

[1] گروه شیلات و بیولوژی دریا، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
[2] گروه شیلات، دانشکده علوم و فناوری نانو و زیستی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
[3] گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

کلمات کلیدی

لاکتوفرین
سیستم ایمنی غیراختصاصی
فاکتورهای بیوشیمیایی خون
فاکتورهای خونی
ماهی شانک زرد باله

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه، مقایسه استفاده از لاکتوفرین به صورت مخلوط با غذا و اسپری بر روی فاکتورهای خونی و پاسخ ایمنی غیراختصاصی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) با میانگین وزنی ۱۰±۰/۳ گرم بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و ۳ تکرار در داخل مخازن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری انجام شد. ماهیان به‌مدت ۳۵ روز با جیره‌های حاوی ۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در هر کیلوگرم غذا به‌صورت اسپری و مخلوط تغذیه شدند. در پایان آزمایش نمونه‌های خون و پلاسما جمع‌آوری شد.

نتایج: نتایج حاصل نشان داد که لاکتوفرین جیره پاسخ ایمنی غیراختصاصی شانک زرد باله را تغییر نداد به‌جز فعالیت لیزوزیم ($P>0/05$). ظرفیت باند شدن آهن و میزان آهن پلاسما به‌صورت معنی‌داری در ماهیان تغذیه شده با ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین به‌صورت مخلوط معنی‌داری تفاوت داشت ($P<0/05$). میزان هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز و سفید در گروه شاهد با تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین به‌صورت مخلوط اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($P<0/05$). با این‌حال میزان هماتوکریت به‌وسیله لاکتوفرین جیره به‌صورت اسپری تحت تاثیر قرار گرفت ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری و بحث: به‌طورکلی، این مطالعه نشان داد که فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی به‌وسیله لاکتوفرین جیره تحت تاثیر قرار گرفت. با این‌حال، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تغذیه ماهی شانک زردباله با جیره حاوی ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین به‌صورت اسپری برای یک دوره ۵ هفته‌ای پاسخ ایمنی غیراختصاصی را افزایش می‌دهد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: v.morshedi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۵ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱۹ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۴ شهریور ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۷ مهر ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.244205.2323

مقدمه

پرورش آبزیان به‌عنوان یکی از فعالیت‌های مهم تولیدی در بسیاری از کشورهای جهان محسوب می‌شود. چرا که با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، این صنعت سهم به‌سزایی در تامین نیازهای غذایی مردم را به عهده دارد. صید آبزیان از منابع آبی از اواخر دهه ۱۹۸۰ تاکنون تقریباً ثابت بوده است. ولی در این مدت تولیدات آبزیان حاصل از آبزی‌پروری رشد قابل توجهی داشته است، به‌طوری‌که در سال ۱۹۸۰ تنها ۴/۷ میلیون تناژ کل تولیدات آبزیان از طریق آبزی پروری بوده که این میزان در سال ۲۰۱۶ به ۸۰ میلیون تن در جهان رسیده است (FAO، ۲۰۱۸). از گونه‌های ماهیان دریایی که از نظر اقتصادی اهمیت دارد ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*) می‌باشد. ماهی شانک زرد باله با نام انگلیسی Yellowfin از خانواده Sparidae است (Vahabnezhad و همکاران، ۲۰۱۷). این ماهی از گونه‌های ساحلی محسوب می‌شود و معمولاً در آب‌های کم‌عمق ساحلی تا عمق ۵۰ متر ساکن است. ماهی شانک یکی از گزینه‌های مناسب پرورشی در کشور است. تکثیر آسان و کیفیت گوشت، بازارپسندی و هم‌چنین یوری‌هالین و یوری‌ترمال بودن این ماهی سبب شده که این گونه جایگاه ویژه‌ای در صنعت تکثیر و پرورش ماهیان دریایی داشته باشد (Robert و Bromage، ۲۰۰۱). با توجه به رشد سریع جمعیت در اکثر کشورها، پرورش نیمه‌متراکم و سنتی جای خود را به‌روش‌های انبوه و متراکم می‌دهد. یکی از مشکلات پرورش متراکم بروز بیماری و عفونت‌های باکتریایی است. امروزه برای پیشگیری از این مشکل استفاده از محرک‌های ایمنی توصیه می‌شود. محرک ایمنی یک ماده شیمیائی- داروئی است که به‌وسیله واکنش مستقیم با سلول‌های سیستم فعال‌کننده آن‌ها پاسخ ایمنی غیراکتسابی را افزایش می‌دهد (عیسوی،۱۳۸۳). در عمل ماده محرک ایمنی می‌تواند مکمل غذائی باشد که باعث کنترل بیماری و افزایش توان مقابله با آن گردد و در انواع موجودات مانند ماهیان کاربرد دارد و با تنظیم سیستم دفاع میزبان در مقابل عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب در محیط باعث افزایش مقاومت در برابر بیماری می‌شود (Gamnam و همکاران، ۱۹۹۹). انواع گسترده‌ای از ترکیبات مختلف وجود دارند که در ماهی پاسخ ایمنی را تحریک می‌کند. بیش‌تر این ترکیبات فقط از راه تزریق موثرند ولی برخی از راه خوراکی و یا غوطه‌وری نیز تاثیر می‌گذارند. یکی از انواع محرک‌های ایمنی لاکتوفرین می‌باشد که در برخی گونه‌های ماهیان مورد مطالعه قرار گرفته است. لاکتوفرین یک نوع گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون (KDa) با باندهای آهن است و شامل زنجیره‌های پپتیدی منفرد با دو لوب کروی در هر مولکول است، که هر کدام دارای یک جایگاه برای باند شدن با آهن می‌باشند(Kumari و همکاران ۲۰۰۳). نقش‌های فیزیولوژیک بسیاری به لاکتوفرین نسبت داده شده است ازجمله این نقش‌ها شامل تنظیم متابولیسم آهن (Welker و همکاران، ۲۰۰۷) حفاظت در مقابل عفونت‌های باکتریائی (Sakai و همکاران، ۱۹۹۳)، تنظیم عملکرد ایمنی (Chand و همکاران، ۲۰۰۶)، تحریک پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی (Kamilya و همکاران، ۲۰۰۶)، افزایش رشد سلول‌های مختلف جانوری شامل لنفوسیت‌ها، افزایش تولید رادیکال آزاد هیدروکسیل توسط نوتروفیل‌ها، و افزایش فاگوسیتوز (Lygren و همکاران، ۱۹۹۹؛Kumari و همکاران، ۲۰۰۳)، شرکت در ترشحات موضعی ایمنی به‌صورت مکمل با ایمنوگلوبولین‌ها و سایر فاکتورهای محافظتی، خواص باند شدن با سموم، فعالیت ضد ویروسی و فعالیت ضدقارچی است (Kumari و همکاران، ۲۰۰۳). لاکتوفرین به حرارت مقاوم بوده، هم‌چنین تا حدودی در برابر تجزیه پروتئولیتیک مقاوم است که نشان‌دهنده این امر است که می‌تواند بر شرایط موجود در تولید غذا، مایعات اسیدی معده و آنزیم‌های پروتئولیتیک روده‌ای فائق آید. این خصوصیات، تجویز خوراکی آن را که امکان تیمار توده‌ای ماهیان را داده و با استرس‌های دستکاری کم‌تری همراه است، فراهم می‌آورد (Kumari و همکاران، ۲۰۰۳). هدف این تحقیق مقایسه تاثیر لاکتوفرین خوراکی به دو روش اسپری و مخلوط با غذا بر پارامترهای فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی و سیستم ایمنی می‌باشد. با توجه به این‌که استفاده از لاکتوفرین گاوی به‌صورت مخلوط با غذا در طی پروسه پخت غذا و اعمال حرارت، مشکلاتی را به‌همراه داد ازجمله ساختار پروتئینی لاکتوفرین در حرارات‌های بالای ۵۰ درجه سانتی‌گراد ممکن است بشکند و غیرفعال گردد، بهتر است به‌دنبال یک روش کارآمد و آسان‌تر بود که در مطالعه حاضر اسپری کردن در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

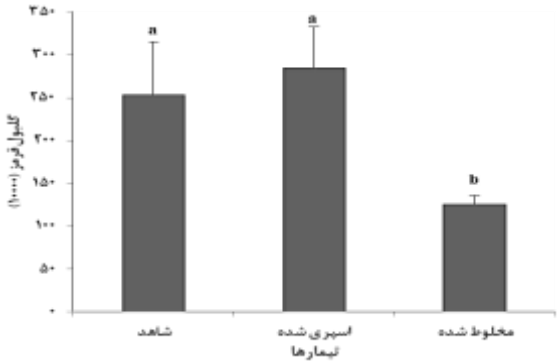
ماهیان این تحقیق از ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی پژوهشکده خلیج‌فارس (دانشگاه خلیج‌فارس، بوشهر) تهیه و با تراکم ۱۰ قطعه در هر مخزن گرد ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی با حجم ۱۵۰ لیتر آب به صورت کاملاً تصادفی در سه تیمار آزمایشگاهی با سه تکرار توزیع شدند. تیمارهای آزمایشی شامل گروه شاهد که غذای کنسانتره بدون لاکتوفرین بود و دو تیمار دیگر، ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در کیلوگرم غذا (شرکت صنایع شیر موریناگا، ژاپن) با درصد خلوص ۹۹٪ خریداری و به دو صورت یکی مخلوط با غذای تجاری و دیگری به صورت اسپری روی غذا ساخته شدند. برای ساخت جیره تیمار مخلوط، مقدار مورد نیاز لاکتوفرین پس از توزین، با غذای کنسانتره پودری

خریداری شده از شرکت بیضا (شیراز، ایران) مخلوط و با استفاده از چرخ گوشت پلت شد و در تیمار اسپری لاکتوفرین بعد از توزین روی غذا اسپری شد. سپس ژلاتین با غلظت ۳ درصد جهت پوشش‌دار کردن غذا و جلوگیری از حل شدن افزودنی در آب، به آن اسپری گردید. پس از آماده‌سازی غذا درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد تا از فساد میکروبی آن جلوگیری شود. قبل از شروع آزمایش، ماهیان به جهت تطابق با شرایط آزمایش به‌مدت ۱۵ روز در مخازن فایبرگلاس نگه‌داری شده و روزانه دو نوبت با جیره تیمار شاهد تغذیه شدند. غذادهی ماهیان روزانه و در دو نوبت و با فاصله زمانی مناسب، در حد سیری انجام شد. شرایط محیطی مثل دوره نوری به صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، دما ۱±۲۹ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷۵ درصد اشباعیت،شوری ۱±۳۸ قسمت در هزار و مقدار pH ۸/۲ در طول آزمایش ۵ هفته‌ای در تمامی مخازن یکسان بود. در پایان دوره خونگیری برای بررسی فاکتورهای ایمنی از ماهیان هر تیمار انجام شد. جهت این کار ابتدا ماهیان به‌طور تصادفی صید و با محلول فنوکسی اتانول (با غلظت ۰/۵ میلی‌لیتر به‌ازاء هر لیتر آب) بی‌هوش گردیدند. جهت بررسی وضعیت فیزیولوژیک ماهیان پس از ۵ هفته تغذیه، به‌صورت تصادفی از هر تیمار گرفته شد و سپس با استفاده از سرنگ ۳ میلی‌لیتری، خون از سیاهرگ دمی گرفته شد پس از خونگیری مقداری از خون به لوله‌های حاوی هپارین جهت جلوگیری از لخته شدن برای اندازه‌گیری فاکتورهای خونی انتقال یافت و باقی‌مانده خون به ظروف بدون هپارین برای تهیه سرم انتقال یافت.نمونه‌های خون به‌مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد تا لخته شوند و سپس به‌مدت ۵ دقیقه در g ×۱۶۰۰ سانتریفیوژ شدند (Webb و همکاران، ۲۰۰۷) سرم با استفاده از سمپلر جداسازی و در دمای ۸۰ - درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. برای شمارش تعداد گلبول‌های سفید (WBC) از پیپت ملانژور سفید استفاده گردید. نمونه‌های خونی با محلول اسیدکلریدریک ۱ درصد به‌همراه کریستال ویوله (با نسبت ۱ به ۲۰) رقیق گردید و خوب مخلوط شد. سپس درون پیپت ملانژور سفید ریخته شد. برای شمارش، از چهار مربع کناری که برای شمارش گلبول‌های سفید خون است استفاده شد. برای محاسبه تعداد سلول‌ها عدد به‌دست آمده در ۵۰ ضرب و تعداد گلبول‌های سفید در یک میلی‌مترمکعب از خون محاسبه گردید (Barros و Evans، ۲۰۰۲). تعداد گلبول قرمز با استفاده از لام نئوبار بعد از رقیق‌سازی خون منعقد نشده با محلول ریس (با نسبت ۱ به ۲۰۰) شمارش شد. از مربع میانی (۵ خانه وسط) لام نئوبار برای شمارش گلبول قرمز استفاده و عدد به‌دست آمده در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب شد. تعداد گلبول‌های قرمز در یک میلی‌مترمکعب خون محاسبه گردید(Barros و Evans، ۲۰۰۲) جهت اندازه‌گیری هماتوکریت لوله‌های موئینه هپارینه با نمونه‌های خون پر شد و پس از آن با خمیر مخصوص بسته‌شد و به‌وسیله سانتریفیوژ میکروهماتوکریت با سرعت g× ۷۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مقدار حجم سلولی یا هماتوکریت هر نمونه خون محاسبه شد (Rehulka، ۲۰۰۲). مقدار هموگلوبین هر نمونه خون به‌وسیله کیت مخصوص شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) وبه‌روش کلرومتریک با طول موج ۵۴۰نانومتر در دستگاه اسپکتوفتومتر، مقدار جذب نور ثبت و غلظت هموگلوبین محاسبه شد (Drobkin، ۱۹۴۵) فعالیت لایزوزیم سرم براساس روش Cha و همکاران (۲۰۰۸) و بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت حساس به آنزیم لایزوزیم (*Micrococcus lysodiekticus*) اندازه‌گیری شد. به این منظور ابتدا یک سوسپانسیون با محلول کردن ۲. میلی‌گرم از سلول‌های لیوفریزه *M. lysodiekticus* (سیگما، آمریکا) در یک میلی‌لیتر بافر سیترات سدیم ۲. مولار (pH ۵/۵) تهیه شد. ۱۵ میکرولیتر از سرم یا موکوس رقیق شده، درون حفره‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و سپس ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری در بافر به آن افزوده و مخلوط گردید .جذب نوری نمونه‌ها هر ۵ دقیقه یک بار تا ۶۰ دقیقه به کمک الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد . از لایزوزیم استخراج شده از سفیده تخم مرغ (سیگما، آمریکا)، جهت تهیه منحنی استاندارد استفاده شد و هر واحد از فعالیت لایزوزیم براساس کاهش جذب (۰/۰۰۱ در دقیقه) تعیین شد. فعالیت همولیتیک براساس همولیز، (ACH_{50}) مسیر فرعی کمپلمان، براساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش با روش Waley و North (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. آلبومین طبق روش ذکر شده توسط Doumas و همکاران (۱۹۹۷) و پروتئین کل طبق‌روش ذکرشده روش Tietz (۱۹۸۲) اندازه‌گیری‌شد. غلظت آهن پلاسما با استفاده از روش رنگ‌سنجی ZiestChem (Diagnostics،تهران، ایران) در ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Hoppe، ۲۰۰۳). مجموع ظرفیت اتصال آهن (TIBC) با روش رسوب کربنات منیزیم (کیت TIBC مغناطیسی) مورد آزمایش قرار گرفت که بر اساس آن به آهن اجازه می‌دهد که با هر جای موجود در ترانسفرین متصل شود و پس از آن رسوب آهن با کربنات منیزیم تشکیل می‌شود و در نهایت باقی‌مانده آهن اندازه‌گیری شد (Tietz، ۱۹۹۹).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: طرح این آزمایش به‌طور کاملاً تصادفی انجام گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و مقایسه میانگین شاخص‌های مورد بررسی با پس‌آزمون توکی و با استفاده از نرم‌افزار SPSSV.15 انجام گرفت.در تمام بررسی‌ها سطح، معنی‌دار بودن تفاوت‌ها $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

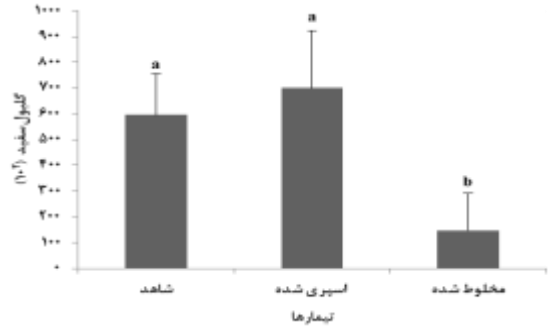
نتایج

نتایج مربوط به تعداد گلبول‌های قرمز خون بچه‌ماهیان تغذیه شده به‌مدت ۵ هفته با لاکتوفرین به دو صورت اسپری و مخلوط در شکل ۱ ارائه شده است. تعداد گلبول‌های قرمز در پایان آزمایش بین تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P >۰/۰۵$). تعداد گلبول قرمز گروه شاهد با تیمار اسپری اختلاف معنی‌داری نداشت اما با تیمار مخلوط اختلاف معنی‌داری نشان داد. بیش‌ترین تعداد گلبول قرمز در تیمار اسپری و کم‌ترین در تیمار مخلوط مشاهده شد.



شکل ۱: اثر لاکتوفرین جیره به‌صورت مخلوط و اسپری بر تعداد گلبول‌های قرمز خون (میانگین±SD) بچه‌ماهیان شانک زرد باله بعد از ۵ هفته

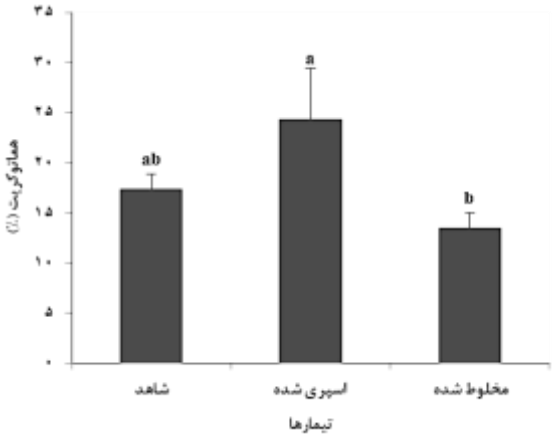
نتایج مربوط به تعداد گلبول‌های سفید بچه ماهیان در شکل ۲ نشان داده شده است. تعداد گلبول‌های سفید ماهیان تیمار اسپری با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) اما تعداد گلبول‌های سفید تیمار مخلوط در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود (P<۰/۰۵). بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد گلبول سفید به‌ترتیب در تیمار اسپری و مخلوط بود.



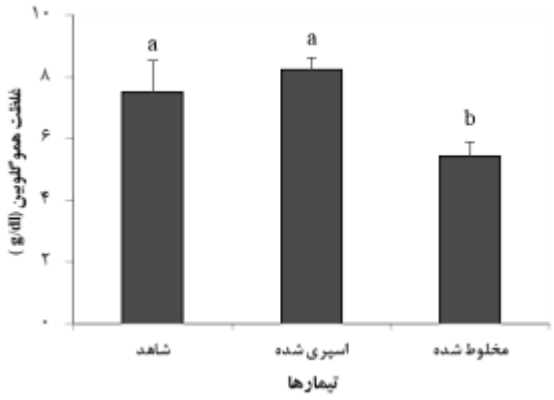
شکل ۲: اثر لاکتوفرین جیره به‌صورت مخلوط و اسپری بر تعداد گلبول‌های سفید خون (میانگین±SD) بچه‌ماهیان شانک زرد باله بعد از ۵ هفته

نتایج مربوط به مقدار هماتوکریت بچه‌ماهیان تغذیه شده با ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین به‌صورت مخلوط و اسپری با غذا در شکل ۳ مشاهده می‌شود. اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارها مشاهده نشد (P > ۰/۰۵).

نتایج مربوط به مقدار هموگلوبین خون بچه‌ماهیان شانک زردباله تغذیه شده با لاکتوفرین در شکل ۴ آمده است. اختلاف معنی‌داری در مقدار هموگلوبین بین تیمار اسپری و گروه شاهد مشاهده نشد اما مقدار هموگلوبین در تیمار مخلوط به‌طور معنی‌داری کم‌تر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار هموگلوبین به‌ترتیب در تیمار اسپری و مخلوط بود.



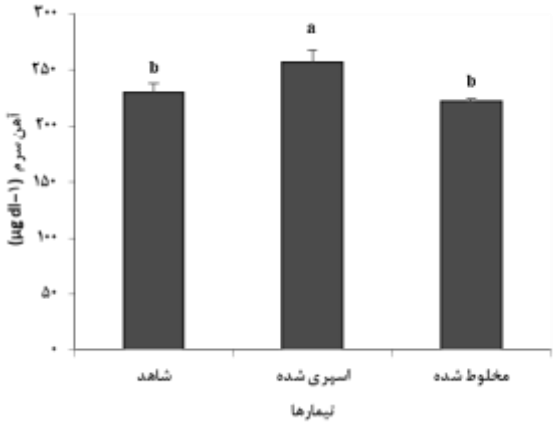
شکل ۳: اثر لاکتوفرین جیره به‌صورت مخلوط و اسپری بر درصد هماتوکریت (میانگین±SD) بچه‌ماهیان شانک زرد باله بعد از ۵ هفته



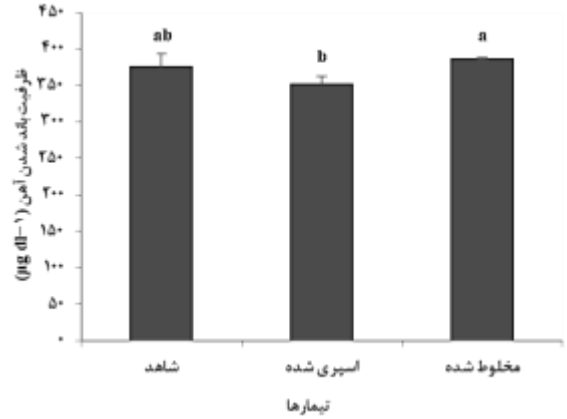
شکل ۴: اثر لاکتوفرین جیره به‌صورت مخلوط و اسپری بر میزان هموگلوبین خون (میانگین ±SD) بچه‌ماهیان شانک زرد باله بعد از ۵ هفته

مقدار آهن سرم در پایان آزمایش بین تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). مقدار آهن سرم بین گروه شاهد و تیمار مخلوط اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما بین گروه شاهد و تیمار اسپری اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵) (شکل ۵). بیش‌ترین مقدار آهن سرم در تیمار اسپری بود و کم‌ترین میزان در تیمار مخلوط مشاهده شد.

شکل ۶ حاوی نتایج مربوط به میزان باند شدن آهن سرم در بچه‌ماهیان تغذیه شده با ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در کیلوگرم غذا به دو صورت اسپری و مخلوط است. اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بیش‌ترین و کم‌ترین میزان باند شدن آهن به‌ترتیب در تیمار مخلوط و اسپری بود.



شکل ۵: اثر لاکتوفرین جیره به‌صورت مخلوط و اسپری بر میزان آهن سرم (میانگین±SD) بچه‌ماهیان شانک‌زردباله بعد از ۵ هفته

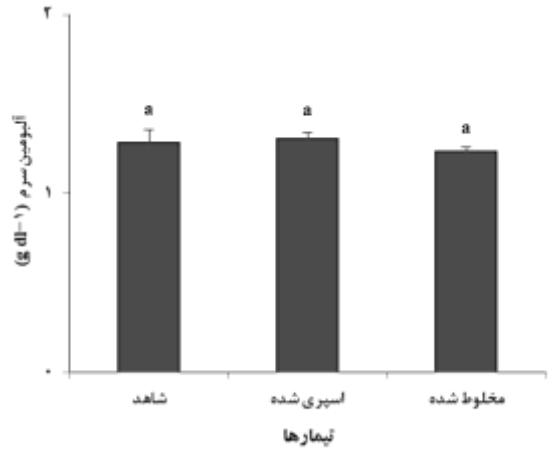


شکل ۶: اثر لاکتوفرین جیره به‌صورت مخلوط و اسپری بر ظرفیت باند شدن آهن سرم (میانگین±SD) بچه‌ماهیان شانک زرد باله بعد از ۵ هفته

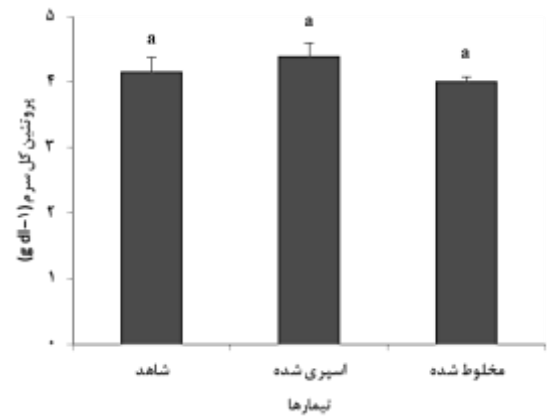
نتایج مربوط به میزان آلبومین سرم بچه‌ماهیان در شکل ۷ نشان داده شده است. اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵). مقادیر آلبومین سرم در تیمار اسپری بیش‌ترین و در تیمار مخلوط کم‌ترین مقادیر بود.

نتایج مربوط به میان پروتئین کل سرم بچه‌ماهیان در شکل ۸ نشان داده شده است. اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). مقادیر پروتئین کل سرم در تیمار اسپری بیش‌ترین و در تیمار مخلوط کم‌ترین مقادیر بود.

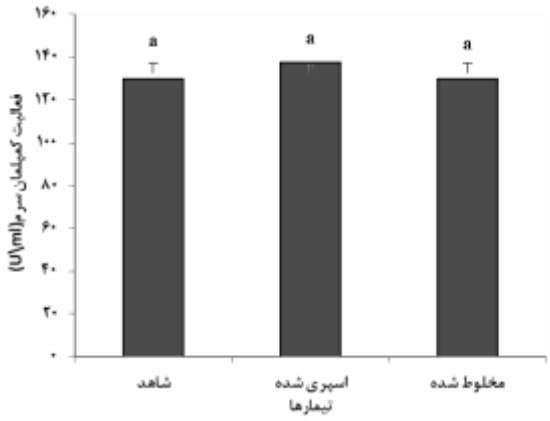
اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد در میزان فعالیت کمپلمان سرم مشاهده نشد (شکل ۹). مقادیر فعالیت کمپلمان سرم در تیمار مخلوط بیش‌ترین و در دو گروه شاهد و تیمار اسپری یکسان بود.



شکل ۷: اثر لاکتوفرین جیره به‌صورت مخلوط و اسپری بر میزان آلبومین سرم (میانگین±SD) بچه‌ماهیان شانک زرد باله بعد از ۵ هفته

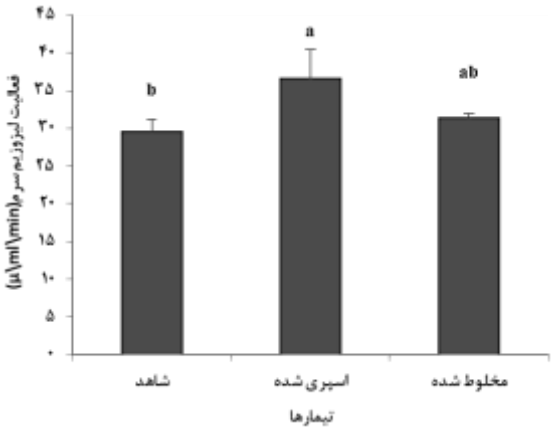


شکل ۸: اثر لاکتوفرین جیره به‌صورت مخلوط و اسپری بر میزان پروتئین کل سرم (میانگین±SD) بچه‌ماهیان شانک زرد باله بعد از ۵ هفته



شکل ۹: اثر لاکتوفرین جیره به‌صورت مخلوط و اسپری بر فعالیت کمپلمان سرم (میانگین±SD) بچه‌ماهیان شانک زرد باله بعد از ۵ هفته

شکل ۱۰ حاوی نتایج مربوط به فعالیت لیزوزیم سرم در بچه ماهیان تغذیه شده با ۸۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در کیلوگرم جیره به مدت ۵ هفته است. بین تیمار اسپری و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵) اما بین تیمار مخلوط و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد(P>۰/۰۵). بیش‌ترین و کم‌ترین مقادیر فعالیت لیزوزیم به‌ترتیب در تیمارهای اسپری و شاهد مشاهده شد.



شکل ۱۰: اثر لاکتوفرین جیره به‌صورت مخلوط و اسپری بر فعالیت لیزوزیم سرم (میانگین±SD) بچه‌ماهیان شانک زرد باله بعد از ۵ هفته

بحث

خون با دارا بودن ترکیبات مختلف، در ایجاد پاسخ ایمنی معین، ایجاد حالت بافری در مقابل تغییرات pH و حفظ فشار اسمزی (نقل و انتقال آب از میان دیواره مویرگ‌ها) و با داشتن سلول‌های خونی نظیر گلبول‌های سفید برای تولید پادتن، بیگانه‌خواری باکتری‌ها و ...، گلبول‌های قرمز برای نقل و انتقال مواد غذایی و گازها همواره نقش مهمی را ایفا می‌کند(Sattari، ۱۳۸۱).از این‌رو تمایل به‌شناخت سیستم ایمنی ماهیان به‌واسطه اهمیت این سیستم برای اهداف آبزی پروری و ارزیابی سلامت ماهیان روز به روز در حال افزایش است و سیستم ایمنی ماهیان به‌وسیله وضعیت‌های مختلف تغذیه‌ای تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Atamanalp و Yanik، ۲۰۰۳). نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده لاکتوفرین به‌صورت مخلوط و اسپری بر غذا می‌تواند تاثیر معنی‌داری بر میزان گلبول قرمز ماهی شانک زردباله داشته باشد به طوری‌که در تیمار مخلوط با غذا مقدار این فاکتور به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و تیمار اسپری روی غذا پایین‌تر بود. در همین راستا نتایج تحقیقات Kawakami و همکاران (۱۹۸۸) بر روی موش نشان داد که لاکتوفرین با اثراتی که بر جذب آهن می‌گذارد باعث بهبود افزایش تعداد گلبول‌های قرمز خون می‌شود. با این‌حال مطالعات Kakuta و همکاران (۱۹۹۸)، Ren و همکاران (۲۰۰۷)، Welker و همکاران(۲۰۰۷) و Eslamloo و همکاران (۲۰۱۲) به‌ترتیب تاثیر لاکتوفرین جیره را بر شاخص‌های خونی کپورمعمولی، ماراهی ژاپنی، تیلاپیا نیل و تاس‌ماهی سیبری بررسی کردند.نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که سطوح مختلف لاکتوفرین جیره تاثیر معنی‌داری بر روی تعداد گلبول‌های قرمز در مقایسه با گروه شاهد ندارد. به‌نظر می‌رسد که عواملی مانند شرایط فیزیولوژیک جانور و هم‌چنین میزان آهن موجود در غذا، در قابلیت بهبود بخشیدن به پارامترهای خون‌شناسی توسط لاکتوفرین موثر است (Eslamloo و همکاران ۲۰۱۲). عواملی مانند شرایط آماده سازی لاکتوفرین تجاری مورد استفاده ازجمله حرارت (Lonnerdal، ۲۰۰۹)،گونه‌ماهی، اندازه‌ماهی، میزان لاکتوفرین جیره، شرایط پرورشی، شرایط تغذیه‌ای، شرایط سلامت بدن و استرس نسبت داده شود (McCarthy و همکاران، ۱۹۷۳). هم‌چنین برخی محققین بیان کرده‌اند که اثرات سینرژیستی لاکتوفرین با اجزای ناشناخته تشکیل‌دهنده جیره‌های تجاری ممکن است در عملکرد ماهیان تاثیرگذار باشد مکانیسم اثرگذاری لاکتوفرین بر شاخص‌های رشد و ایمنی هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است (Yokoyama و همکاران، ۲۰۰۶). هم‌چنین لاکتوفرین یکی از مولفه‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی است که نقش‌های فیزیولوژیک بسیاری به آن نسبت داده شده است. این نقش‌ها شامل تنظیم متابولیسم آهن (Welker و همکاران، ۲۰۰۷)، تحریک پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی (Kamilya و همکاران، ۲۰۰۶) و ... می‌باشد. متغیرهایی نظیر گونه ماهی، جنس، سن، سیکل بلوغ جنسی، شرایط تغذیه‌ای، شرایط سلامت بدن و استرس نیز می‌توانند پارامترهای خون‌شناسی را تغییر دهند هم‌چنین همان‌طورکه در مطالعه حاضر مشاهده شد نحوه استفاده از لاکتوفرین در جیره هم می‌تواند بر تعداد گلبول‌های قرمز خون موثر باشد. لاکتوفرین می‌تواند تاثیرات مختلفی روی گلبول‌های سفید در موجودات مختلف بگذارد (Wakabayashi و همکاران، ۲۰۰۶). در تحقیق حاضر استفاده لاکتوفرین به‌صورت مخلوط روی جیره تاثیر معنی‌داری بر کاهش تعداد گلبول سفید بچه‌ماهیان داشته است. از سویی دیگر Welker و همکاران(۲۰۰۷) و Eslamloo و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تاثیر لاکتوفرین بر شاخص‌های خونی گزارش دادند که تعداد گلبول سفید ماهیان تیلاپیای نیل و تاس‌ماهی سیبری تغذیه شده با لاکتوفرین و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار ندارد. نتایج این تحقیق نشان داد که نوع استفاده از لاکتوفرین بر میزان هماتوکریت تاثیر ندارد. نتایج تحقیقات Kakuta و همکاران (۱۹۹۸)، Ren و همکاران (۲۰۰۷)، Welker و همکاران (۲۰۰۷) و Eslamloo و همکاران (۲۰۱۲)، به ترتیب اثر لاکتوفرین جیره را بر فاکتورهای خونی کپورمعمولی، ماراهی ژاپنی، تیلاپیا نیل و تاس‌ماهی سیبری بررسی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که سطوح مختلف لاکتوفرین جیره تاثیر معنی‌داری بر میزان هماتوکریت در مقایسه با گروه شاهد ندارد. از سویی دیگر در مطالعه Kawakami (۱۹۸۸) روی موش، لاکتوفرین با اثراتی که بر جذب آهن می‌گذارد باعث بهبود کم‌خونی و افزایش میزان هماتوکریت شده است. میزان هموگلوبین در تحقیق حاضر در تیمار مخلوط با غذا به‌طور معنی‌داری کم‌تر از دیگر گروه‌ها بود. در مطالعه

Kawakami(۱۹۸۸)میزان هموگلوبین موش بعد از تغذیه با لاکتوفرین افزایش یافت. نتایج تحقیقات Kakuta و همکاران (۱۹۹۸) بر کپور معمولی، Renو همکاران (۲۰۰۷)بر مارماهی ژاپنی، Welker و همکاران (۲۰۰۷) ، تیلاپیا نیل و Eslamloo و همکاران (۲۰۱۲) بر تاس‌ماهی سیبری نشان داد که سطوح مختلف لاکتوفرین جیره تاثیر معنی‌داری بر روی میزان هموگلوبین در مقایسه با گروه شاهد ندارند که با نتایج این تحقیق در تیمار اسپری روی غذا هم‌خوانی دارند. عواملی مانند شرایط فیزیولوژیک جانور و هم‌چنین میزان آهن موجود در غذا، در قابلیت بهبود بخشیدن به پارامترهای خون‌شناسی توسط لاکتوفرین موثر است(Eslamloo و همکاران ۲۰۱۲).هم‌چنین می‌تواند به عواملی مانند شرایط آماده‌سازی لاکتوفرین تجاری مورد استفاده از جمله حرارت (Lonnerdal، ۲۰۰۹)،گونه ماهی، اندازه ماهی، میزان لاکتوفرین جیره و شرایط پرورشی مرتبط باشد (Eslamloo و همکاران ۲۰۱۳). سطح آهن سرم و ظرفیت باند شدن آهن به‌عنوان دو پارامتر بیوشیمیایی عمده در ماهی تغذیه شده با لاکتوفرین در نظر گرفته می‌شود (Moradian و همکاران، ۲۰۱۸). در این آزمایش میزان آهن سرم به‌طور معنی‌داری در تیمار اسپری نسبت به گروه شاهد و تیمار مخلوط بیش‌تر بود ولی ظرفیت باند شدن آهن تحت تاثیر تیمارهای لاکتوفرین قرار نگرفت. یافته‌های مربوط به تاثیر لاکتوفرین بر روی متابولیسم آهن در موجودات ظاهراً متناقض و گاهی مخالف یکدیگر است.به‌عنوان مثال Kawakami (۱۹۸۸) با استفاده از رژیم‌های غذایی حاوی لاکتوفرین و مکمل آهن باعث بهبود پارامترهای هماتولوژی موش‌های کم‌خون شد. با این‌حال، این پارامترها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر قرار نگرفت (Rahimnejad و همکاران، ۲۰۱۱).این تفاوت‌ها می‌تواند به‌مدت استفاده از لاکتوفرین و غلظت استفاده از آن یا توانایی ماهی برای استفاده از لاکتوفرین نسبت داده شود. کمبود آهن در سرم به‌عنوان پاسخ مشترک برخی از حیوانات به عفونت باکتریایی محسوب می‌شود و به‌عنوان یک واکنش احتمالی دفاعی در برابر تهاجم میکروبی است(Brown و Holden، ۲۰۰۲). بنابراین، کمبود آهن در سرم به‌علت ظرفیت نگه‌داری آهن لاکتوفرین به‌عنوان یکی از راه‌های جلوگیری از بیماری‌های خاص در سیچلاید آفریقایی درنظر گرفته شده است. پروتئین کل و اجزای اصلی آن، آلبومین نقش مهمی در فعالیت سیستم ایمنی بدن در گونه‌های مختلف ازجمله ماهی دارد (Moradian و همکاران، ۲۰۱۸). براساس نتایج تحقیق حاضر، نحوه استفاده لاکتوفرین تاثیر معنی‌داری بر میزان آلبومین و پروتئین کل سرم نداشته است. نتایج این تحقیق با نتایج Chand و همکاران (۲۰۰۶) بر میگوی آب شیرین تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم لاکتوفرین بر کیلوگرم غذا، هم‌خوانی ندارد.سیستم کمپلمان در ماهیان از مهم‌ترین اجزای تشکیل دهنده ایمنی غیراختصاصی هستند و در پاسخ به تغییرات فیزیولوژیک و پاتولوژیک تغییر می‌کنند (Ellise، ۱۹۹۹). در تحقیق حاضر استفاده لاکتوفرین به‌صورت اسپری و مخلوط تاثیر معنی‌داری بر فعالیت کمپلمان سرم بچه‌ماهیان شانک زرد باله نداشت. میزان فعالیت کمپلمان ماهی آزاد اقیانوس اطلس پس از ۱۹ روز تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین تغییر معنی‌داری نکرد (Lygren و همکاران، ۱۹۹۹).هم‌چنین لاکتوفرین جیره هیچ نوع تاثیر معنی‌داری روی فعالیت همولیتیک کمپلمان سرم ماهی شانک سرطلائی (*Sparus auratus* L)نداشت(Esteban و همکاران، ۲۰۰۵).هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که میزان فعالیت کمپلمان ماهی تیلاپیای نیل پس از ۸ هفته تغذیه با سطوح مختلف لاکتوفرین تغییر نمی‌کند (Welker و همکاران، ۲۰۰۷b). نتایج Eslamloo و همکاران (۲۰۱۲) و Rahimnejad و همکاران (۱۳۹۰) نیز نشان داد که میزان فعالیت سیستم کمپلمان مسیر فرعی سرم (ACH_{50}) ماهیان تحت تأثیر لاکتوفرین جیره قرار نمی‌گیرد (Chipman و Sharon، ۱۹۶۹). مکانیسم اثرات لاکتوفرین بر فعالیت لیزوزیم هنوز ناشناخته است.با این حال، گیرنده‌های لاکتوفرین در انواع مختلفی از سلول‌های ایمنی در حیوانات مختلف کشف شده‌اند، به‌طوری که انتظار می‌رود که لاکتوفرین بتواند واکنش‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی را تحت تاثیر قرار دهد (Hwang و Kruzel، ۲۰۰۹). به‌طورکلی فعالیت‌های لیزوزیم سرم با سلول‌های فاگوسیتیک، گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها ارتباط دارد. لیزوزیم سرم نیز توسط ماکروفاژهای بافتی ترشح می‌شود (Alhazmi و همکاران، ۲۰۱۴). نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده لاکتوفرین به‌صورت اسپری تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت لیزوزیم سرم بچه‌ماهیان شانک زرد باله داشت. مشابه با نتایج تحقیق حاضر Ren و همکاران (۲۰۰۷) و Rahimnejad و همکاران (۲۰۱۲) گزارش دادند که فعالیت لیزوزیم در سرم مارماهی ژاپنی و قزل‌آلای رنگین‌کمان با تغذیه از سطوح مختلف لاکتوفرین افزایش می‌یابد. در مقابل Kumari و همکاران (۲۰۰۳) تاثیر سه غلظت لاکتوفرین شامل ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا را بر پاسخ ایمنی غیراختصاصی گربه‌ماهی آسیایی (*Clarias batrachus*) در طول دو هفته مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایشات آن‌ها نشان داد که لاکتوفرین در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم باعث افزایش معنی‌دار سطوح لیزوزیم سرم در مقایسه با تیمار شاهد در پایان هفته اول می‌شود، با این‌حال، در پایان هفته دوم سطوح لیزوزیم در تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم نسبت به دو گروه دیگر بالاتر بود اما اختلاف آن‌ها معنی‌دار نبود. Lygren و همکاران (۱۹۹۹) تاثیر غلظت ۱۴۰ میلی‌گرم لاکتوفرین در کیلوگرم غذا را همراه با دو غلظت ویتامین C بر روی فعالیت لیزوزیم سرم و فعالیت لیزوزیم بخش قدامی کلیه در ماهی آزاد اطلس مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که لاکتوفرین جیره تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های ایمنی بررسی شده ندارد. میزان فعالیت لیزوزیم سرم در ماهی آزاد، تیلاپیای نیل و تاس‌ماهی سیبری پس از تغذیه با سطوح متفاوت لاکتوفرین اختلاف معنی‌دار نشان نداد (Eslamloo و همکاران، ۲۰۱۲؛ Lygren و همکاران ۱۹۹۹؛ Welker و همکاران، ۲۰۰۷b). در مورد مکانیزم عمل لاکتوفرین بر فعالیت لیزوزیم اطلاعاتی در دسترس نیست. مطالعات نشان داده است که عوامل متعددی بر میزان و نیز قدرت ضدباکتریائی لیزوزیم بافت‌های مختلف ماهیان تاثیرگذار است، که از

آن جمله می‌توان به فصل، جنس، گونه، سن، عوامل کیفی آب به‌ویژه درجه حرارت، تغذیه، مرحله بلوغ جنسی، تحریک آنتی‌ژنی و عوامل استرس‌زا اشاره کرد (Saurabh و Sahoo، ۲۰۰۸). به‌طورکلی با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق پیشنهاد می‌شود، لاکتوفرین به صورت اسپری بر جیره، استفاده شود.

منابع

1. **Alhazmi, A.; Stevenson, J.W.; Amartey, S. and Qin, W., 2014.** Discovery, modification and production of T4 lysozyme for industrial and medical uses. Int J Biol. Vol. 6, No. 4, pp: 45-63.
2. **Atamanalp, T. and Yanik, M., 2003.** Alterations in hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to mancozeb. Turkish J Vet Anim Sci. Vol. 27, pp: 1213-1217.
3. **Barros, M.M., Lim, C. and Evans, J.J., 2002.** Effect of Iron Supplementation to Cottonseed Meal Diets on the Growth Performance of Channel Catfish , *Ictalurus punctatus*. J Appl Aquac. pp: 37-41.
4. **Bromage, N.R. and Robert, R.G., 2001.** Broodstock mamagement and egg larval quality. Blackwell Science. 425 p.
5. **Brown, J.S. and Holden, D.W., 2002.** Iron acquisition by Gram- positive bacterial pathogens. Microbes Infect. Vol. 4, pp: 1149-1156.
6. **Chand, R.K.; Sahoo, P.K.; Kumari, J.; Pillai, B.R. and Mishra, B.K., 2006.** Dietary administration of bovine lactoferrin influences the immune ability of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection and nitrite stress. Fish Shellfish Immunol. Vol. 21, pp: 119-129.
7. **Cha, S.H.; Lee, J.S.; Song, C.B. and Jeon, Y.J., 2008.** Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. Vol. 278, pp: 110-118.
8. **Chipman, D.M. and Sharon, N., 1969.** Mechanism of lysozyme action. Science. Vol. 165, pp: 454-465.
9. **Drabkin, D., 1945.** Crystallographic and optical properties of human hemoglobin: a proposal for the standardization of hemoglobin. Am J Med Sci. Vol. 209, pp: 268-270.
10. **Doumas, B.T.; Watson, W.A. and Biggs, H., 1977.** Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. Clin Chim Acta. Vol. 258, pp: 21-30.
11. **Ellise, A.E., 1999.** Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol. Vol. 9, pp: 291-308.
12. **Eslamloo, K.; Falahatkar, B. and Yokoyama, S., 2012.** Effects of dietary bovine lactoferrin on growth, physiological performance, iron metabolism and non-specific immune responses of Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. Fish Shellfish Immunol. Vol. 32, pp: 976-985.
13. **Esteban, M.A.; Rodrı, A.; Cuesta, A.; Rodríguez, A.; Cuesta, A. and Meseguer, J., 2005.** Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). Fish Shellfish Immunol. Vol. 18, pp: 109-124.
14. **FAO. 2018.** The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome.
15. **Gamnam, A.L. and Sehrock, R.M., 1999.** Immuno stimulants in fish diets. J Appl Aquac. Vol. 9, pp: 68-79.
16. **Hwang, S.A. and Kruzel, M., 2009.** Influence of bovine lactoferrin on expression of presentation molecules on BCG infected bone marrow derived macrophages. Biochem. Vol. 91, pp: 76-85.
17. **Hoppe, M. and Hulthén, L., 2003.** Serum iron concentration as a tool to measure relative iron absorption from elemental iron powders in man. Scand J Clin Lab Invest. Vol. 63, pp: 489-496.
18. **Kamilya, D.; Ghosh, D.; Bandyopadhyay, S.; Mal, B.C. and Maiti, T.K., 2006.** In vitro effects of bovine lactoferrin, mushroom glucan and Abrus agglutinin on Indian major carp, catla (*Catla catla*) head kidney leukocytes. Aquaculture. Vol. 253, pp: 130-139.
19. **Kakuta, I., 1998.** Reduction of stress response in carp, *Cyprinus carpio* L., held under deteriorating environmental conditions, by oral administration of bovine lactoferrin. J Fish Dis. Vol. 21, pp: 161-168.
20. **Kawakami, H. and Hiratsuka, M.D.S., 1988.** Effects of iron- saturated lactoferrin on iron absorption. Agric Biol Chem. Vol. 52, pp: 903- 908.
21. **Lönnerdal, B., 2009.** Nutritional roles of lactoferrin. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. Vol.12, No. 3, pp: 293-297.
22. **Lygren, B.; Sveier, H.; Hjeltness, B. and Waagbø, R., 1999.** Examination of the immunomodulatory properties and the effect on disease resistance of dietary bovine lactoferrin and vitamin C fed to atlantic salmon (*Salmo salar*) for a short-term period. Fish Shellfish Immunol. Vol. 9, pp: 95-107.
23. **McCarthy, D.H.; Stevensom, J.P. and Roberts M.S., 1973.** Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). J Fish Biol. Vol. 5, pp: 1-8.
24. **Moradian, A.M.; Dorafshan, S.; Paykan Heyrati, F. and Ebrahimi, E., 2018.** Effects of dietary bovine lactoferrin on growth, haemato-biochemical parameters, immune functions and tolerance to air exposure stress in the African cichlid *Sciaenochromis fryeri*. Aquac Nutr. Vol. 24, pp: 392-399.
25. **Rahimnejad, S.; Agh, N.; Kalbassi, M. and Khosravi, S., 2011.** Effect of dietary bovine lactoferrin on growth, haematology and non-specific immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquac Res. pp: 1-9.
26. **Rehulka, J., 2000.** Influence of astaxanthin on growth rate , condition , and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Vol. 190, pp: 27-47.
27. **Ren, T.; Koshio, S.; Ishikawa, M.; Yokoyama, S.; Micheal, FR. and Uyan, O., 2007.** Influence of dietary vitamin C and bovine lactoferrin on blood chemistry and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture. Vol. 267, pp: 31-37.
28. **Sakai, M.; Otubo, T.; Atsuta, S. and Kobayashi, M., 1993.** Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) by oral administration of bovine lactoferrin. J of Fish Diseases. Vol. 16, pp: 239-247.
29. **Sattari, M., 2002.** Ichthyology (1). Anatomy and physiology. Naghsh Mehr Publications in collaboration with Guilan University. 659 p.
30. **Saurabh, S. and Sahoo, P.K., 2008.** Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquac Res. Vol.39, pp: 223-239.
31. **Tietz, N.W. and Andresen, B.D., 1986.** Textbook of clinical chemistry.
32. **Vahabnezhad, A.; Taghavimotlagh, S. and Ghodrati Shojaei, M., 2017.** Growth pattern and reproductive biology of *Acanthopagrus latus* from the Persian Gulf. Surv Fish Sci. Vol. 4, pp: 18-28.
33. **Wakabayashi, H.; Yamauchi, K. and Takase M., 2006.** Lactoferrin research, technology and applications. Int Dairy J. Vol. 16, pp: 1241-1251.
34. **Webb, M.A.H.; Allert, J.A.; Kappenman, K.M.; Marcos, J.; Feist, G.W.; Schreck, C.B. and Shackleton, C.H., 2007.** Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in response to stress. Gen Comp Endocrinol. Vol. 154, pp: 98-104.
35. **Welker, T.L.; Lim, C.; Yildirim-aksoy, M. and Klesius, P.H., 2007.** Growth , immune function , and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin. Aquaculture. Vol. 262, pp: 156-162.
36. **Whaley, K. and North, J., 1997.** Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. Complement: A Pract Approach. Vol. 1, pp: 19-47.
37. **Yokoyama, S.; Koshio, S.; Takakura, N.; Oshida, K.; Ishikawa, M.; Gallardo-Cigarroa, F.J. and Teshima, S.I., 2006.** Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. Aquaculture. Vol. 255, No. 1-4, pp: 507-513.